

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. R. von Fellenberg

**Bestimmung von Immunglobulinen und Proteaseinhibitoren
in Blut und Bronchialsekret
sowie
ihr «Relative Coefficient of Excretion»
bei Pferden mit COPD**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

JOSEF PRELLER

Tierarzt
von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. von Fellenberg, Referent
PD Dr. H. Lutz, Korreferent

Zürich 1986

OFFSETDRUCKEREI AG

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. R. von Fellenberg

Bestimmung von Immunglobulinen und Proteaseinhibitoren
in Blut und Bronchialsekret
sowie
ihr «Relative Coefficient of Excretion»
bei Pferden mit COPD

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

JOSEF PRELLER

Tierarzt
von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. von Fellenberg, Referent
PD Dr. H. Lutz, Korreferent

Zürich 1986

OFFSETDRUCKEREI AG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

MEINER FRAU
UND
MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	7
	1. Allgemeines	7
	2. Bild der COPD des Pferdes	7
	3. Abwehrmechanismen des Respirationstraktes	11
	3.1. Allgemeines	11
	3.2. Bronchialsekret (BS)	12
	3.3. Immunglobuline (Ig) des Pferdes	13
	3.4. Proteaseinhibitoren (PI) des Pferdes	20
	4. Problemstellung	24
II	MATERIAL UND METHODEN	26
	1. Pferde und Gruppeneinteilung	26
	2. Seren und Bronchialsekrete	26
	3. Proteinkonzentrationsbestimmungen	26
	4. Statistische Auswertung	30
	5. RCE	30
III	ERGEBNISSE	32
	1. Serumkonzentrationen	32
	2. Konzentrationen im BS	38
	3. RCE	44
IV	DISKUSSION	46
	1. Serumkonzentrationen der Ig	46
	2. Serumkonzentrationen der PI	48
	3. Ig-Konzentrationen im BS	49
	4. PI-Konzentrationen im BS	51
	5. Albuminkonzentrationen in Serum und BS	52
	6. RCE der Ig und PI im BS	52
V	ZUSAMMENFASSUNG	54
VI	LITERATURVERZEICHNIS	56

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

α_1 -AT	=	alpha-1-Antitrypsin
α_2 -M	=	alpha-2-Makroglobulin
α_1 -PI	=	alpha-1-Proteaseinhibitor
BALT	=	bronchus-associated lymphoid tissue
BS	=	Bronchialsekret
COPD	=	chronic obstructive pulmonary disease
Fab	=	fraction cristallizing
Fc	=	fraction antigen binding
Ig	=	Immunglobulin(e)
pO ₂	=	Sauerstoffpartialdruck
PI	=	Proteaseinhibitor(en)
RCE	=	relative coefficient of excretion
RID	=	radiale Immundiffusion
SC	=	secretory component
sIg A	=	sekretorisches Ig A

I EINLEITUNG

1. Allgemeines

Ein grösserer Teil der Pferdepopulation leidet an Erkrankungen des Respirationstraktes (GERBER 1969, DAMMANN-TAMKE 1982, BOULTON et al. 1983). Die Mehrheit dieser Lungenleiden lässt sich klinisch als COPD (= chronic obstructive pulmonary disease) diagnostizieren. Der Grund dieser so häufig diagnostizierten Erkrankung lag lange im dunkeln und auch heute noch ist das äthiologische und pathogenetische Geschehen der COPD beim Pferd nicht vollständig erfasst.

Aus anatomisch-pathologischer Sicht stellt man fest, dass die obstruktiven Veränderungen in den betroffenen Pferdungen vor allem durch chronisch entzündliche Prozesse der luftführenden Wege zustande kommen. Bei diesem Faktum muss man sich die Fragen stellen, durch welche Faktoren die entzündlichen Vorgänge hervorgerufen werden, wie es zur Chronizität der Vorgänge kommt und welche Pathomechanismen dem Geschehen zugrunde liegen. Weiter wäre es interessant zu wissen, durch welche Parameter sich diese Pathomechanismen beschreiben lassen.

Um diesen Problemen auf den Grund gehen zu können, ist es nötig, das Bild der chronischen Lungenerkrankungen des Pferdes zu beschreiben, und vor allem die Abwehrstrukturen und -mechanismen des Respirationstraktes im Detail zu erfassen, was in den folgenden Ausführungen versucht wird.

2. Bild der COPD des Pferdes

A) Klinisch manifestiert sich die COPD beim Pferd als ein Symptomenkomplex (SASSE 1971). Am ehesten fällt anamnestisch ein chronischer Husten auf, der sich über

Monate hinweg hält. Gleichzeitig lassen sich Nasenausfluss und ein eventueller Leistungsabfall feststellen. Weiter kann man oft eine anfallsweise oder persistierende Atemnot beobachten, bei der folgende Ursachen ausgeschlossen werden müssen:

- a) lokalisierte Lungenleiden (z.B. Pneumonien),
- b) generalisierte spezifische Lungeninfektionen (z.B. Lungenwürmer),
- c) cardiovasculäre Primärkrankheiten,
- d) generalisierte Fibrosen und Granulome und
- e) Veränderungen der Pleura (CIBA GUEST SYMPOSIUM 1959).

Weiter beobachtet man meistens einen abdominal betonten Atemtyp. Bei der Lungenauscultation, die vielfach erst nach Atemhemmung oder Stimulation aussagekräftig ist, fallen oft pathologische Geräusche wie Rasseln, Giemen und Krepitieren auf. Die kaudalen Lungengrenzen sind nicht selten erweitert. Ein ausgezeichnetes Mittel zur Betrachtung des Zustandes der oberen Luftwege bietet die Bronchoskopie (FISCHER 1980). Bei diesem Untersuch sind oft vermehrte Schleimmassen und verdickte höckerige Schleimhäute anzutreffen. Die zytologische Beurteilung des entnommenen Bronchialsekretes (BS) liefert ein weiteres fast unentbehrliches diagnostisches Hilfsmittel (FISCHER 1980, GRUENIG 1984). Hierbei spielt vor allem die Menge der neutrophilen Granulozyten im BS eine wesentliche Rolle, denn mit steigendem COPD-Schweregrad wird auch ein Anstieg der Neutrophilen im BS nachgewiesen (DECONTO 1983, GRUENIG 1984). Messungen des arteriellen pO_2 (SASSE 1971, FISCHER 1980) liefern bei der Beurteilung des Schweregrades der COPD sehr nützliche Hinweise, man sollte jedoch die Diagnose nicht allein mit dem pO_2 -Wert begründen.

- B) Pathologisch-anatomisch lässt sich an den Lungen der chronischlungenkranken Pferde, die den Gegenstand

unserer Untersuchung bilden, feststellen, dass Veränderungen vor allem an den luftführenden Wegen, den Bronchen und Bronchiolen, das Bild beherrschen (DAHME und WEISS 1978).

Makroskopisch lässt sich der Verdacht einer Bronchitis/Bronchiolitis nur anhand von Schleimmassen, die die betroffenen Strukturen füllen und zum Teil obliterieren, aussprechen. Bei der histopathologischen Verifizierung des vorliegenden Verdachts trifft man folgende Veränderungen an (DAMMANN-TAMKE 1982):

- angeschwollene Epithelstrukturen, die oft Metaplasien und Hyperplasien aufweisen, wobei vermehrt Becherzellen gesichtet werden,
- Desquamation der Epithelzellen, Schwund von Flimmerepithelzellen und lymphozytäre Infiltrate im Epithel
- subepitheliale lymphozytäre Infiltration, die auch peribronchiolär und teils auch perivaskulär beobachtet wird (WINDER 1986),
- bei schwerwiegenden Fällen stellt man nicht selten Anzeichen fest, die auf ein alveoläres Emphysem schliessen lassen,
- in wenigen Fällen, bei denen klinisch die gleiche Diagnose COPD gestellt wird, lassen sich Anzeichen einer Hypersensibilitätspneumonie im Sinne der "Farmer's lung" beim Menschen beobachten (PAULI et al. 1972).

C) Bezüglich des äthiologisch-pathogenetischen Bildes der COPD beim Pferd herrschen bis heute noch die grössten Unklarheiten.

a) Das chronisch entzündliche Geschehen in den Bronchen/Bronchiolen könnte durch folgend aufgeführte Faktoren verursacht werden:

- virale Infekte, die mit oder ohne sekundäre bakterielle Infektionen den Respirationstrakt schwächen

- und als Wegbereiter der chronischen Prozesse wirken können (GERBER 1973, DAMMANN-TAMKE 1982),
- antigenetische Reize der respiratorischen Epithelien durch ubiquitäre primär nicht pathogene Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Milben, Pollen) sowie Heu-, Strohstaubpartikel, die chronisch allergische Prozesse in Gang bringen könnten (HALLIWELL et al. 1979, GRUENIG 1984).
- b) Die Obstruktion der Bronchien/Bronchiolen stellt die wesentlichste Veränderung dar, die das pathologische Bild der COPD beherrscht. Für die Entstehung der Obstruktion kann man folgende Mechanismen annehmen:
- durch den chronischen Reiz des Respirationstraktes kommt es zur Vermehrung von Becherzellen im Bronchial- und Bronchiolenepithel, was wiederum zur erhöhten Schleimproduktion führt (SCHOON und DEEGEN 1983),
 - durch die chronische Entzündung der Epithelien kommt es zur vermehrten Exudation von Plasmabestandteilen ins Bronchialsekret, die ihrerseits auf eine Beeinträchtigung der selektiven Permeabilität hindeutet (REYNOLDS und MERRILL 1980). Weiter wandern beim Pferd vermehrt Leukozyten, vor allem neurophile Granulozyten, ins Epithel und Bronchialsekret ein (NUYTEN et al. 1983),
 - Bronchospasmen kommen als alleiniger Grund für eine Obstruktion der Bronchen/Bronchiolen beim Pferd wahrscheinlich nur sehr vereinzelt in Frage (DAMMANN-TAMKE 1982),
 - Lumeneinengende Wandprozesse als Zeichen einer chronischen Entzündung, wie Hyper- und Metaplasien des Epithels, peribronchiale Rundzellproliferation, Lymphfollikelbildungen und Fibrosierungen der Bronchen/Bronchiolen sind auch an der Obstruktion mitbeteiligt (SCHOON und DEEGEN 1983).

c) Für die Entstehung des nicht selten festgestellten alveolären Lungenemphysems bei der Pferde-COPD können folgende Hypothesen aufgeführt werden:

- mechanisch bedingt könnte es durch obstruierte Bronchen/Bronchiolen zur Hyperinflation (air trapping) kommen, wobei dann bei chronischen Hustenstößen die Alveolarsepten einreißen könnten (DAMMANN-TAMKE 1982),
- der beobachtete Kapillarschwund der Alveolarwände könnte zu einer Unterversorgung der Alveolarwandzellen führen, was für deren Schwund verantwortlich gemacht werden könnte (GILLESPIE und TYLER 1967 und 1969).

Im Gegensatz zu den zwei vorgehend erwähnten Hypothesen, wird die nachfolgend aufgeführte Theorie durch experimentelle Resultate untermauert.

- Durch intratracheale Instillation elastolytischer Proteasen lässt sich nämlich ein alveoläres Lungenemphysem erzeugen, wie dies GROSS et al. 1965, KARLINSKY und SNIDER 1978, WEINBAUM et al. 1974 und JOHANSON et al. 1972 an Tiermodellen zeigen konnten. Die Tatsache, dass ein genetisch determinierter α_1 -Antitrypsinmangel beim Menschen die Entstehung von panlobulären Lungenemphysemen beeinflusst, (LAURELL und ERIKSSON 1964) zeigt, dass Proteasen und Proteaseinhibitoren eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Emphysemen spielen können.

3. Abwehrmechanismen des Respirationstraktes

3.1. Allgemeines

Der Respirationstrakt setzt sich mit mechanischer und biochemischer Wehr mit Fremdorganismen und -partikeln auseinander. Zur mechanischen Abwehr gehören die Filtration der Atemluft durch die behaarten Naseneingänge, die Clea-

rence durch den mukoziliären Apparat (NELSON und HAMPE 1983), der Husten, die Schleim- und Epithelbarrieren und zuletzt die Phagozytose. Bei der biochemischen Abwehr lassen sich antigenunspezifische und antigenspezifische (= immunologische) Systeme, die ineinander spielen, unterscheiden. Zu unspezifischen biochemischen Mechanismen zählen z.B. das Lysozym (HERMANN, R. 1984), Proteasen und Proteaseinhibitoren (McDERMOT et al. 1982, FRETZ 1984). Das Komplement-System stellt die Verbindung zu den immunologischen Mechanismen her. Die immunologischen Vorgänge gliedert man in zelluläre und humorale Komponenten. Die zelluläre Immunabwehr stützt sich vor allem auf die Makrophagen und T-Lymphozyten ab. Immunglobuline bilden den Kern der humoralen Immunabwehr.

3.2. Bronchialsekret (BS)

Das Bronchialsekret stellt eine sehr komplexe Lösung von organischen und anorganischen Substanzen (LOPEZ-VIDRIERO und REID 1978), die zellenhaltig ist, dar. Die Substanzen und Zellen stammen von folgenden Ursprungsstätten ab:

- a) von Mukus-sezernierenden subepithelialen Drüsen, die nur in knorpelhaltigen Atemwegen vorkommen,
- b) von Becherzellen und serösen Zellen, die in der obersten Epithelschicht vorkommen,
- c) von spezialisierten Zellen wie Plasma- und Mastzellen,
- d) von Kapillaren als Ursprungsort der Plasmabestandteile
- e) von BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) (BIENENSTOCK, 1985), den möglichen Ursprungsort der Lymphozyten (BIENENSTOCK et al. 1973). Die Herkunft der übrigen Leukozyten im BS ist heute noch nicht vollständig geklärt (McDERMOT et al. 1982).

Das Sekret des Respirationstraktes des Menschen enthält mindestens 95% Wasser. Die verbleibenden 5% bestehen hauptsächlich aus makromolekularem Material, das sich grob

in folgende Fraktionen unterteilen lässt:

2-3% Glykoproteine, 0.1 - 0.5% Proteine und 0.3 - 0.5% Lipide (LOPEZ-VIDRIERO und REID 1978).

Die morphologischen und funktionellen Aspekte der verschiedenen mukosalen Substanzen sind in der Artikelserie von CLAMP (Editor) 1978 detailliert erörtert. In der vorliegenden Arbeit richtet sich das Augenmerk auf die Proteinfraction, in der uns vor allem die folgend beschriebenen Immunglobuline und Proteaseinhibitoren interessieren.

3.3. Immunglobuline (Ig) des Pferdes

a) Struktur der Ig

Immunglobuline stellen mehrkettige Proteine dar, die aus vier Polypeptidketten bestehen. Jedes Ig-Molekül (Monomer) besteht aus zwei niedermolekularen Polypeptidketten (L-Ketten) und aus zwei hochmolekularen Polypeptidketten (H-Ketten), die durch nichtkovalente Bindungen und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (TOMASI und GREY 1972). Es kommen jedoch auch Polymerformen vor, deren Monomere durch Glykoproteine (J-Ketten) miteinander verbunden sind (TOMASI und BIENENSTOCK 1968, KOSHLAND 1975). Das Vorkommen der J-Ketten konnte bei den Pferde-Ig noch nicht schlüssig nachgewiesen werden (ROBERTS 1975). Bei den zwei Ig-Klassen IgA und IgM konnte in den Sekreten ein sogenanntes SC-Stück (secretory component) nachgewiesen werden (NEWCOMB et al. 1968, MACH 1970), das den jeweiligen Antikörpermolekülen eine gewisse Resistenz gegen Proteolysis verleiht (BROWN et al. 1970). Weiter scheint das SC-Stück eine wichtige Rolle beim Transport von IgA-Molekülen in die Sekrete zu spielen (CRAGO et al. 1978).

b) Klassifizierung der Ig

Analog den menschlichen Ig-Klassen versuchte man eine entsprechende Klassifizierung der equinen Ig auszuarbeiten.

Kriterien, die zur Klassifizierung der Ig herbeigezogen werden, sind in der Arbeit von TOMASI und GREY 1972 erwähnt. Bis heute ist es beim Pferd gelungen, 7 antigene-tisch verschiedene Immunglobuline zu isolieren und teil-weise zu charakterisieren. Drei Immunglobuline IgGa, IgGb und IgGc wurden als Subklassen von IgG identifiziert (KLINMAN et al. 1965). In der Arbeit von WEIR und PORTER 1966 wurde endlich bestätigt, dass die equine T-Komponente die vierte IgG-Subklasse darstellt, die IgG T benannt wurde. Das sogenannte "aggregating immunoglobulin" (AI) (ZOLLA und GOODMAN 1968) wurde als mögliche fünfte IgG-Sub-klasse beschrieben. ALLEN und JOHNSON 1972 bezeichneten das AI endgültig als eine IgG-Subklasse und benannten sie IgG B. Die Existenz einer IgM-Klasse beim Pferd wurde von KABAT und PEDERSON 1938 nachgewiesen. Es konnten bis heute keine equinen IgM-Subklassen festgestellt werden (MONTGOMERY 1973). Mehrere Studien haben die Existenz einer IgA-Klasse beim Pferd bestätigt (McGUIRE und CRAW-FORD 1972, PAHUD und MACH 1972, VAERMAN et al. 1971).

c) Physikalische Eigenschaften der Ig des Pferdes

(Tabelle 1)*

Parameter	Ig G-Sub- klassen	Ig M	Ig A
Molekulargewicht (Daltons)			
Serum	152'000	1'000'000	150'000-700'000 Mehrheit bei 350'000
Sekrete	152'000	1'000'000	Mehrheit 350'000 (mit SC-Stück)
Sedimentsions- konstante $[S]$			
Serum	7	19.8	7
Sekrete	7	19.8	11.2
Elektrophore- tische Mobili- tät	γ	$\beta - \gamma$	γ
Aggregations- zustand			
Serum	Monomere	Pentamere	vorwiegend Dimere, Teil Monomere
Sekrete	Monomere	Pentamere	vorwiegend Dimere

* wurde nach ROBERTS M.C. 1975, McGuire et al. 1972 und
HERMANN 1984 zusammengestellt

d) Funktionen der Immunglobuline

An Ig-Monomeren kann man funktionell zwei verschiedene Bereiche feststellen. Das Fc-Fragment, welches sich aus den C-ständigen Hälften der beiden H-Ketten zusammensetzt, und zwei Fab-Fragmente, die jeweils aus dem Rest einer H-Kette und aus einer L-Kette gebildet werden. Die beiden Fab-Fragmente sind für die Bindung an das entsprechende Antigen verantwortlich. Die Antigenbindung wird als Primärfunktion der Ig definiert. Die sekundären Antikörperfunktionen, zu denen vor allem die Komplementaktivierung und die Adhärenz an Zelloberflächen von Leukozyten gehören, lassen sich auf die Strukturen des Fc-Fragmentes zurückführen. In der Folge werden die wichtigsten Ig-Funktionen kurz erläutert.

- Opsonierung, Adhärenz an Zelloberflächen

Antikörper sind fähig sich mit dem Fc-Fragment an Membranen von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu binden. Dadurch wird die Aufnahme von Antigenpartikeln in phagozytierende Zellen erleichtert. Dieser Mechanismus wird durch die Einwirkung von Komplement noch verstärkt.

- Komplementaktivierung

Durch die Bindung von Ig-Molekülen an ihr entsprechendes Antigen wird das Komplementsystem auf dem klassischen oder alternativen Weg aktiviert. Daraus resultieren vor allem Zerstörungen der Zellmembranstrukturen von Mikroorganismen, die schlussendlich zur Zytolyse führen.

- Virus- und Toxinneutralisierung

Die Anlagerung von Antikörpern an ihr entsprechendes Antigen (Virus, Toxin) bewirkt, dass die betroffenen Antigene sterisch in ihren biologischen Wirkungen gehindert werden.

Als weitere Funktionen der Ig werden Hemmung der Kolonisation von Bakterien auf Schleimhautoberflächen, Präzi-

pitation, Agglutination und Hämagglutination beschrieben (von FELLEBERG 1978a).

e) Ursprung der Immunglobuline

Antikörper (Immunglobuline) werden von Plasmazellen, welche sich aus B-Lymphozyten differenzieren, synthetisiert. Die B-Lymphozyten sind Abkömmlinge von Knochenmark-Stammzellen und haben auch die Fähigkeit, sich zu immunologischen Gedächtniszellen zu differenzieren. Diese Gedächtniszellen besitzen die Eigenschaft, bei sekundärem Antigenkontakt schnell und effektiv Ig zu synthetisieren und auszuschütten. Modulierend auf die Synthese und Freisetzung der Ig wirken antigenpräsentierende Makrophagen und spezialisierte T-Lymphozyten (Helferzellen). Antikörperbildende Plasmazellen findet man hauptsächlich in lymphoiden Geweben und Organen wie Milz, Lymphknoten, Lamina propria der Schleimhäute des Darmtraktes (Peyer'sche Platten) und der Luftwege (BALT). Entzündete Gewebe weisen auch einen erhöhten B-Lymphozytengehalt auf (von FELLEBERG 1978a).

f) Herkunft der Ig im Bronchialsekret

Es gibt zwei Arten, wie Immunglobuline ins Bronchialsekret gelangen können. Einmal werden Immunglobuline aktiv oder passiv aus dem Serum ins BS transportiert. Als zweite Möglichkeit kommt die lokale Ig-Produktion in der Bronchialschleimhaut in Frage.

- Ig A

Sekretorisches Ig A (sIg A) ist das dominierende Immunglobulin in Sekreten, so auch im Bronchialsekret, wo es vorwiegend als Dimer mit SC-Stück vorliegt (TOMASI und BIENENSTOCK 1968). Ein grosser Teil des sIg A scheint aus lokaler Synthese zu stammen, denn Ig A-produzierende Plasmazellen sind der dominierende B-Zelltyp in der

Mukosa des Respirationstraktes (BRADLEY et al. 1976). Das synthetisierte Ig A-Dimer wird von der Ig A-produzierenden Zelle ins Interstitium ausgeschieden (BIENENSTOCK und STRAUSS 1970), und gelangt anschliessend in die Epithelzellen. In den Epithelzellen wird an das Ig A-Dimer das SC-Stück gekoppelt (BRANDTZAEG 1974). Die Koppelung des Ig A-Dimers an das SC-Stück scheint essentiell für den weiteren Transport zu sein (CRAGO et al. 1978). Das nun fertige sIg A wird durch umgekehrte Pinozytose ins Sekret freigesetzt (McDERMOTT et al. 1982). Weiter kann man belegen, dass auch im Serum zirkulierende Ig A-Moleküle in Speichel, Galle und Milch ausgeschieden werden (McDERMOTT et al. 1982).

- Ig G

Im Serum stellt die Ig G-Klasse konzentrationsmässig den grössten Anteil der Immunglobuline (GREEN et al. 1977). Das Sekret des Respirationstraktes des Menschen enthält auch beträchtliche Ig G-Mengen, die knapp an die des Ig A reichen. In Epithelien des Respirationstraktes des Menschen findet man Ig G-positive Zellen, so dass man eine lokale Produktion annehmen kann (MARTINEZ-TELLO 1968). Für den Transport von Ig G-Molekülen nimmt man den gleichen Mechanismus wie für die Ig A-Moleküle an, es findet jedoch keine Koppelung an das SC-Stück statt. Im unteren Respirationstrakt vergrössert sich die Ig G-Menge, die fast an die Serumkonzentration heranreicht. Diese hohen Konzentrationen kann man mit passiven Transportprozessen erklären. Weiter scheint es, dass je tiefer man in den Respirationstrakt vordringt, desto mehr kommen Mechanismen der systemischen Immunität zum Zug (KALTREIDER und CHAN 1976).

- Ig M

In Sekreten des Respirationstraktes ist das Ig M im

Gegensatz zum Serum in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Wie beim Ig A und Ig G scheint das Ig M lokal synthetisiert zu werden, denn es werden Ig M-Zellen in der Mukosa der Luftwege gefunden, jedoch in geringer Anzahl (MARTINEZ-TELLO 1968). Weil das Ig M-Molekül ein sehr hohes Molekulargewicht (1'000'000 Daltons) aufweist, nimmt man an, dass nur ein kleiner Prozentsatz des im BS vorhandenen Ig M vom Serum filtriert wird. MACH 1970 und BRANDTZAEG 1974 konnten zeigen, dass das Ig M fähig ist, sich, wie Ig A, mit SC-Stücken zu verbinden.

g) Auswirkungen von COPD-Zuständen auf Ig-Spiegel im Serum und BS

Ueber Veränderungen von Immunglobulinmengen im BS bei Krankheiten des Respirationstraktes liegen wenige und zum Teil kontroverse Ergebnisse vor. Die meisten Arbeiten, die sich mit diesem Themenkreis befassen, stammen aus der Humanmedizin. GUMP et al. 1973 haben im Sputum von chronischen Bronchitikern gleich hohe Konzentrationen von Ig G und Ig A feststellen können, wobei Ig M nicht nachgewiesen werden konnte. In Seren dieser Patienten wurde eine Erhöhung aller drei Ig-Klassen gegenüber gesunden Kontrollen beobachtet, wobei nur die Ig G-Konzentration signifikant erhöht war. WENDEL und TESSENOW 1981 stellten in Seren von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis eine starke Erhöhung der Ig A-Konzentration, eine erniedrigte Ig G-Konzentration und eine unveränderte Ig M-Konzentration fest. FALK et al. 1972, die Ig-Konzentrationsmessungen in Seren und Bronchialwaschungen von COPD-Patienten durchgeführt haben, sind zum Schluss gekommen, dass ein Ig-Mangel weder im Blut noch im BS mit der COPD vergesellschaftet ist. HERMANN 1984 beobachtete bei COPD-kranken Pferden einen Anstieg des Ig A:Ig G-Quotienten im BS mit steigendem Schwere-

grad. Für diesen relativen Ig A-Anstieg wird die zunehmende Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance bei hochgradiger COPD des Pferdes verantwortlich gemacht.

3.4. Proteaseinhibitoren (PI) beim Pferd

Es ist bekannt, dass Proteasen an vielen biologischen Abläufen mitbeteiligt sind. Zu diesen zählen Proteinmetabolismus, Blutkoagulation, Fibrinolyse, Entzündung und Immunabwehr. Proteaseinhibitoren stehen proteasekatalysierten Prozessen als modulierende und limitierende Faktoren gegenüber. Pathogene Proteasen können als Ursachen für die Entstehung von Schädigungen in Frage kommen, wenn einer oder mehrere der folgend aufgeführten Zustände vorliegen (JANOFF 1983):

- a) fehlende oder ungenügende Komplementarität zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren
- b) Kumulation von Proteasen
- c) Inhibitorendefizit.

In bezug auf chronische Lungenschädigungen konnten LAURELL und ERIKSSON 1964 und 1965 erstmals nachweisen, dass ein hereditär bedingter α_1 -Antitrypsin-Mangel beim Menschen für das Auftreten von panacinären Lungenemphysemen verantwortlich gemacht werden kann. Durch experimentelle Applikation von Elastase aus humanen neutrophilen Granulozyten konnten JANOFF et al. 1977 bei Hunden emphysemartige Schäden hervorrufen. WEINBAUM et al. 1976 konnten zeigen, dass man elastaseinduzierte Emphyseme bei Hunden, durch gleichzeitige Applikation einer in Hundelungen isolierten Antiprotease, verhindern kann.

Im Falle der COPD des Pferdes wäre es durchaus denkbar, dass Proteasen und Proteaseinhibitoren am Zustandekommen dieses Leidens eine wichtige Rolle spielen könnten (von FELLEBERG 1978b). Um diesen begründeten Verdacht abzuklären, wurden bereits zahlreiche Arbeiten getätigt. So

zeigte FRETZ 1984, dass bei COPD-Pferden die α_1 -Proteaseinhibitor-Aktivität im Serum deutlich reduziert war. GRUENIG 1984 stellte fest, dass Heustaub und Pferdelungen erhebliche Mengen an elastaseproduzierenden Mikroorganismen enthalten. Im Bronchialsekret nachgewiesene Mikroorganismen korrelieren jedoch nicht mit dem COPD-Schweregrad. In der Mehrheit der untersuchten Pferde-Bronchialsekrete konnten biologisch aktives α_1 -PI und α_2 -M festgestellt werden.

Pathogene Proteasen, die schädliche Wirkungen auf Gewebe des Respirationstraktes (Alveolarepten, Bronchiolen) ausüben können, sind exogenen und endogenen Ursprungs. Mikroorganismen, die im Heustaub vorkommen, sind ein möglicher Ursprung exogener Proteasen (Elastasen) (GRUENIG 1984). Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen, sind Produzenten von endogenen Elastasen (OHLSSON und OLSSON 1973 und 1974, RINDLER und BRAUNSTEINER 1975). Pferdeleukozyten wurden von DUBIN et al. 1976 auf neutrale Enzyme untersucht, wobei eine schwach elastolystische Protease gefunden wurde.

Als Gegenspieler der erwähnten Proteasen werden Proteaseinhibitoren angenommen. In neuerer Zeit gelang es, die Plasmainhibitoren teilweise zu charakterisieren (von FELLENBERG 1978b, PELLEGRINI und von FELLENBERG 1980, PELLEGRINI et al. 1983a + b). Als wichtigste und wirksamste Proteaseinhibitoren wurden der α_1 -PI und das α_2 -M nachgewiesen. In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die Eigenschaften der Plasmainhibitoren des Pferdes zusammengefasst.

Tabelle 2* : Plasmainhibitoren des Pferdes

Inhibitor	Molekulargewicht	elektrophoretische Wanderung	inhibitorische Aktivität
			Trypsin Chymotrypsin Elastase Thrombin Plasmin Collagenase
α_2 -M ¹⁾	720'000	α_2	+ + + + (+)
α_1 -PI ²⁾	65'000	α_1	+ + + - -
AT-III ³⁾	65'000- 73'000	α_2	+ - - + - -
Pre- α_2 -EI ⁴⁾	188'000- 225'000	Pre- α_2	+ - + - -

- 1) α_2 -Makroglobulin; 2) α_1 -Proteaseinhibitor;
 3) Antithrombin III; 4) Pre- α_2 -Elastase-Inhibitor

* übernommen von FRETZ 1984

Bezüglich der exakten biologischen Funktionen der oben erwähnten α_1 -PI und α_2 -M ist man sich noch nicht vollständig im klaren. Sicherlich sind die inhibitorischen Eigenschaften der beiden Proteaseinhibitoren gegenüber Proteasen die wichtigsten Funktionen im Zusammenhang mit Lungenschädigungen. Weiter werden Einflüsse der beiden Proteaseinhibitoren auf Immunabläufe in der Lunge diskutiert. So wird beschrieben, dass Alveolarmakrophagen (SCHNITZLEIN et al. 1980) und Ig A-Immunkomplexe (TOMASI und HAUPTMAN 1974) Rezeptoren für α_1 -PI besitzen. Auch dem α_2 -M wird eine mögliche regulatorische Funktion der entzündlichen Abläufe in der Lunge zugesprochen (McDERMOTT et al. 1982).

Auf welche Art und Weise der α_1 -PI und das α_2 -M in die Sekrete des Respirationstraktes gelangen ist nicht näher bekannt. Das α_1 -AT scheint gänzlich durch Diffusionsprozesse aus der Blutbahn ins Bronchialsekret zu gelangen. Durch das relativ kleine Molekulargewicht von ca. 65'000 Daltons wäre es dem α_1 -AT sicher möglich, die Blutgewebsschranken zu passieren. Für das Vorkommen des α_2 -M im Bronchialsekret müssen noch zusätzliche Vorgänge angenommen werden, denn dessen Molekulargewicht beträgt ca. 720'000 Daltons. Einerseits kann man annehmen, dass sicherlich ein Teil des α_2 -M durch einfache Passage der Blutgewebsschranke ins BS gelangt. Durch entzündliche Irritationen der Gewebsschranken könnte der Uebertritt noch erleichtert werden. Andererseits ist bekannt, dass kultivierte Lungenfibroblasten fähig sind α_2 -M zu produzieren (MOSHER 1983). Dies lässt vermuten, dass wahrscheinlich ein nicht unwesentlicher Teil des im BS vorhandenen α_2 -M aus lokaler Produktion stammt, wie dies DELACROIX et al. 1985 bei interstitiellen Lungenleiden feststellen konnten. Ob man diese Erkenntnisse auf das Pferd und die COPD des Pferdes übertragen kann, ist unsicher.

4. Problemstellung

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die zytologische Untersuchung des Bronchialsekretes die aussagekräftigsten Hinweise liefert, wenn man den Status quo des Bronchialbaumes von COPD-verdächtigen oder -kranken Pferden objektiv beurteilen will (GRUENIG 1984, DECONTO 1983). Durch unsere Untersuchungen wollten wir versuchen, weitere gut objektivierbare Parameter, die eventuell im Verlauf der COPD des Pferdes Veränderungen unterworfen sind, näher zu charakterisieren. Für diesen Zweck bedienten wir uns einer leichtgradig und einer schwergradig kranken Patientengruppe von COPD-Pferden.

Um über vermutete Auswirkungen auf die humorale Immunität im Verlauf der COPD Auskunft zu erhalten, bestimmten wir die Konzentrationen folgender Immunglobulinklassen im Serum und Bronchialsekret der beiden Patientengruppen:

Ig A

Ig G

Ig G T

Ig M

Pathogenetisch kommt ein Proteaseinhibitorenmangel bezüglich der COPD-Entstehung in Frage. Um abzuklären, ob eventuell ein Inhibitorendefizit, vor allem im Bronchialsekret COPD-kranker Pferde, vorliegen könnte, bestimmten wir die Konzentrationen der beiden wichtigsten Proteaseinhibitoren des Pferdes im Serum und Bronchialsekret:

α_1 -PI und

α_2 -M

Neben der Bestimmung des Gehaltes im Blut und Sekret wollten wir zusätzlich Auskunft über das Ausmass der Sekretion der sechs quantitativ ermittelten Proteine ins Bronchialsekret erhalten. Hierzu verwendeten wir den RCE (relative coefficient of excretion), dessen Aussage in

Kapitel II 5. näher erläutert wird. Um den RCE berechnen zu können, war es nötig, die Albuminkonzentrationen im Serum und Bronchialsekret der beiden Patientengruppen zu bestimmen.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Pferde und Gruppeneinteilung

Die Pferde, deren Seren und Bronchialsekret untersucht wurden, waren Patienten der Klinik für Innere Medizin des Tierspitals Zürich. Anhand der klinischen Diagnose wurden 92 COPD-Fälle in zwei Patientengruppen eingeteilt. Bei der Gruppierung ging man nach dem gleichen Prinzip vor, das bei der Arbeit von GRUENIG 1984 Anwendung fand. Gruppe 1, mit 42 Pferden, stellte sich aus leichtgradigen COPD-Patienten zusammen. 50 Pferde wurden in Gruppe 2 eingeteilt, die sich aus schwergradigen COPD-Patienten rekrutierte. Das Alter der 92 verwendeten Pferde lag zwischen 4 und 20 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 9 ± 4 Jahren für die Gruppe 1 beziehungsweise bei 11 ± 4 Jahren für die Gruppe 2. Die 92 Patienten teilten sich in 61 Wallache, 30 Stuten und einen Hengst auf.

2. Seren und Bronchialsekrete

Die Seren wurden aus dem Blut gewonnen, das während der klinischen Untersuchung aus der Vena jugularis entnommen wurde. Anschliessend wurden die Seren bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Die im Verlauf der Bronchoskopie der oberen Atemwege entnommenen Bronchialsekrete wurden zentrifugiert (60 min bei 50'000 g) und die Ueberstände bei -80°C bis zum Gebrauch eingefroren.

3. Proteinkonzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationen der sieben zur Untersuchung ausgewählten Proteine wurden mit einem einfachen immunologischen Verfahren, der radialen Immundiffusion (RID) nach MANCINI et al. 1965, gemessen. Die RID wird in Agaroseplatten,

denen ein monospezifisches Antiserum gegen das jeweilige Protein beigemischt wird, durchgeführt. Die zu untersuchenden verdünnten Seren und Bronchialsekret-Ueberstände füllt man in Löcher ein, die ins Gel gestanzt wurden. Nach dem Auftragen beginnt die Probelösung radial vom Loch aus ins antikörperhaltige Gel hineinzudiffundieren. Hier binden sich die Proteinmoleküle an ihre entsprechenden Antikörper und die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe präzipitieren. Bei konstanter Antikörpermenge ist der Durchmesser beziehungsweise die Fläche des Präzipitationskreises direkt proportional zur Antigenmenge.

Monospezifische Antiseren gegen Pferde-Albumin, α_2 -M und α_1 -PI wurden in unserem Labor hergestellt und auf Reinheit geprüft (PELLEGRINI et al. 1984, 1983b, 1980). Fc-spezifische Antiseren gegen Pferde-Ig A, -Ig G, -Ig G T und -Ig M wurden von Nordic bezogen und auf Reinheit geprüft.

a) Methodik der RID

Das Trägermedium, die Agarosegel-Platten, wurden wie folgt hergestellt:

1 Teil Agarose (g) (ME Agarose/Seakem^R) wurde in 100 Teilen (ml) 1:4 verdünntem Tris-Barbiturat-Puffer (Tris-Barbiturat-Puffer-Stammlösung 4x konzentriert pH 8.6: 22.4 g Diethylbarbitursäure, 44.3 g Tris, 0.553 g Calciumlactat, 0.65 g Natriumacid, mit Aqua dest. auf 1 l ergänzen) gelöst. Dieses Gemisch wurde bei 100°C zur Auflösung gebracht und anschliessend in einem Wasserbad auf 56°C abgekühlt. Danach füllte man in vorgewärmte Reagenzgläser je 10 ml Agaroselösung ab. Zu diesen 10 ml Agaroselösung wurde jeweils die gewünschte Menge Antiserum (AS) hinzupipetiert (60 μ l Albumin-AS, 100 μ l Ig A-AS, 150 μ l Ig G-AS, 100 μ l Ig G T -AS). Nach kurzem Schütteln goss man das Agarose-Antiserumgemisch auf Trägerfolien

(Agarose Gel Support Medium von FMC Corp, Marine Colloids Division) und liess die gegossene Masse bei Raumtemperatur zum Gel erstarren. Nach 24 Stunden bei einer Temperatur von ca. 10°C erreichte das Gel den gebrauchsfertigen Zustand.

Mittels Punchers und einer Schablone wurden 16 Löcher für die Probelösungen ins Gel gestanzt. In jede Platte pipetierte man eine Verdünnungsreihe des Standardserums, dessen α_1 -PI-, α_2 -M- und Albumin-Konzentrationen bekannt waren und 12 verdünnte Einzelproben, deren Volumen 4.5 μ l betrug. (Verdünnungsflüssigkeit: Tris-Barbiturat-Puffer, pH 8.6, Zusammensetzung siehe oben). Die optimale Probenverdünnung wurde in Vorversuchen für jedes nachzuweisende Protein ermittelt. In der Folge verbrachte man die angesetzten Gelplatten in Feuchtkammern und diese wiederum in einen Kühlschrank (10°C).

Nach einer Inkubationszeit von 70 Stunden konnten die Platten weiter verarbeitet werden. Zuerst wurden die Gelplatten mit einer Lage von 7 Fliessblättern bedeckt (Whatman^R Filter Paper Nr. 1) und die Platten während 10 Minuten unter einem Gewichtsdruck von einem Kilogramm gepresst. Diesen Vorgang wiederholte man während 5 Minuten noch einmal. Anschliessend wurden die gepressten Platten in einer 0.1 molaren NaCl-Lösung gewässert. Nach mindestens 2 Stunden wiederholte man den oben erwähnten Pressvorgang. Im nächsten Schnitt wurden die Platten mittels eines Warmluftgebläses getrocknet.

Zur Sichtbarmachung der Präzipitate wurden die Platten in Coomassie Blue-Lösung (2.5 g Coomassie Brilliant Blue R 250 von Merck und 454 ml Methanol und 92 ml 100%ige Eisigsäure und 454 ml Aqua dest.) gefärbt.

Bei der Sichtbarmachung der Ig M-Präzipitate mit der Coomassie Blue-Färbung stellten sich unbefriedigende Resultate ein, so dass es nötig wurde, auf eine empfindlichere und

komplexe Färbemethode zurückzugreifen. Durch die Silberfärbung nach PORRO et al. 1982 wurde es möglich, bei der Färbung der Ig M-Platten gut auswertbare Resultate zu erzielen. Hierbei wurde folgendermassen vorgegangen. Nach der Inkubationszeit wurden die Ig M-Platten auf die gleiche Weise gepresst und getrocknet, wie sie bei der Coomassie Blue-Färbung Anwendung fand und vorgehend erwähnt wurde. Danach wurde jede Platte einzeln für 15 Minuten in ein dreiprozentiges Glutaraldehydbad (100 ml) gelegt. Nach kurzem Abtropfen wurden die Platten anschliessend einzeln in eine Silbernitrat-Lösung (100 ml) verbracht. In der Silbernitrat-Lösung (210 ml 0.09 molare NaOH und 15.7 ml 25%ige Ammoniaklösung und 10 ml 20%ige Silbernitratlösung mit dest. Wasser auf 1 l ergänzen) belass man die Platten so lange, bis ein befriedigender Kontrast zwischen Präzipitat und Hintergrund sichtbar wurde. Nach 10 bis 15 Minuten stellten sich die besten Resultate ein. Danach spülte man die Platten unter fliessendem Wasser ab und trocknete sie mit einem Warmluftgebläse. Während des Bades im Glutaraldehyd wie auch während der Entwicklungszeit in der Silbernitratlösung ist ein ständiges Schütteln unerlässlich.

b) Auswertung der Platten

Zur exakten Bestimmung der Präzipitattendurchmesser liess man die Platten fotografieren und dreimal vergrössern. Für jede Platte wurde aus den vier mitgeführten Standardserum-Verdünnungen mittels linearer Regression eine Eichkurve berechnet, die wir als Bezugsgrösse für die Konzentrationsberechnung der Einzelproben verwendeten.

Die Konzentrationen des Albumins, α_1 -PI und des α_2 -M sind in absoluten Mengen angegeben (mg/ml bzw. μ g/ml). Weil uns bei der Bestimmung der vier Ig-Klassen kein Standardserum, dessen absoluter Gehalt der einzelnen Ig-Klassen

bekannt war, zur Verfügung stand, mussten wir auf einen relativen Standard zurückgreifen. Zu diesem Zweck bedienten wir uns des Serums eines institutseigenen Pferdes (PP), dessen Gehalt an den vier bestimmten Ig-Klassen wir als 100% definiert haben. Die Ig-Konzentrationen der untersuchten Pferde wurden in PP% angegeben.

4. Statistische Auswertung

Die Ueberprüfung, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich der verschiedenen Parameter vorlagen, führten wir mit Hilfe des parametrischen t-Student-Testes und des verteilungsfreien U-Testes nach Wilcoxon, Mann und Whitney durch (SACHS 1984).

Für die Darstellung normalverteilter Messwerte wählten wir das einfache Säulenhistogramm. Bei schiefen Messdatenverteilungen wendeten wir die Boxplox-Darstellung an. (EGGENBERGER und THUN 1985).

5. RCE (relative coefficient of excretion)

Um Auskunft über das Sekretionsverhalten der Proteine zu erhalten, bedienten wir uns des RCE als Parameter. Der RCE bezieht die Sekretionsrate eines Proteins auf die Sekretionsrate von Serumalbumin (DELACROIX et al. 1985) in der Annahme, das Albumin gelange ungestört durch Ultrafiltration ins Sekret. Der RCE erlaubt den Vergleich von Sekretionsparametern von Proteinen in verschiedenen Körpersekreten, unabhängig vom Wassergehalt der Körpersekrete. Durch den RCE werden auch individuelle Differenzen der Proteinkonzentration in Serum und Sekret relativiert.

$$\text{Gleichung: } RCE = \frac{\text{Protein Sekret}}{\text{Protein Serum}} \bigg/ \frac{\text{Albumin Sekret}}{\text{Albumin Serum}}$$

Für Albumin beträgt der RCE definitionsgemäss 1, und stellt die Bezugsgrösse dar. Erhält man für ein Protein einen RCE grösser als 1, so bedeutet dies, dass dieses Protein besser als Albumin ins entsprechende Sekret ausgeschieden wird. Der Grund könnte im kleineren Molekulargewicht gegenüber Albumin, in lokaler Produktion oder in aktiver Ausscheidung des Proteins liegen. Ist der RCE kleiner als 1, so könnte man dies auf ein grösseres Molekulargewicht des Proteins gegenüber dem Albumin zurückführen. Weiterhin kann man in diesem Fall eine lokale Produktion und aktiven Transport ausschliessen.

III ERGEBNISSE

1. Serumkonzentrationen

a) Albumin

Bezüglich der Serumalbuminkonzentration konnte zwischen den Pferden mit leichtgradiger COPD und schwergradiger COPD kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Tabelle 3 und Abbildung 1 fassen die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (s) der Serumalbuminkonzentrationen der beiden Patientengruppen zusammen.

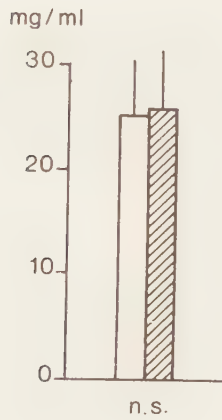
Tabelle 3: Serumalbuminkonzentrationen der beiden Patientengruppen

	Anzahl Pferde	Albuminkonzentration $\bar{x} \pm s$ [mg/ml]
leichtgradige COPD	42	25.9 ± 4.6
schwergradige COPD	50	25.3 ± 6.0
Signifikanz		n.s.*

* nicht signifikanter Unterschied

Abbildung 1:

Serumalbumin - Konzentrationen



□ leichtgradige } COPD
▨ schwergradige }

n.s. = nicht signifikanter Unterschied

b) Immunglobuline

Bezüglich der relativen Serumkonzentrationen aller vier Immunglobulinklassen konnte zwischen den Pferden mit leichtgradiger COPD und schwergradiger COPD kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 4 und Abbildung 2 fassen die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (s) der Serumkonzentrationen der vier Ig-Klassen beider Patientengruppen zusammen.

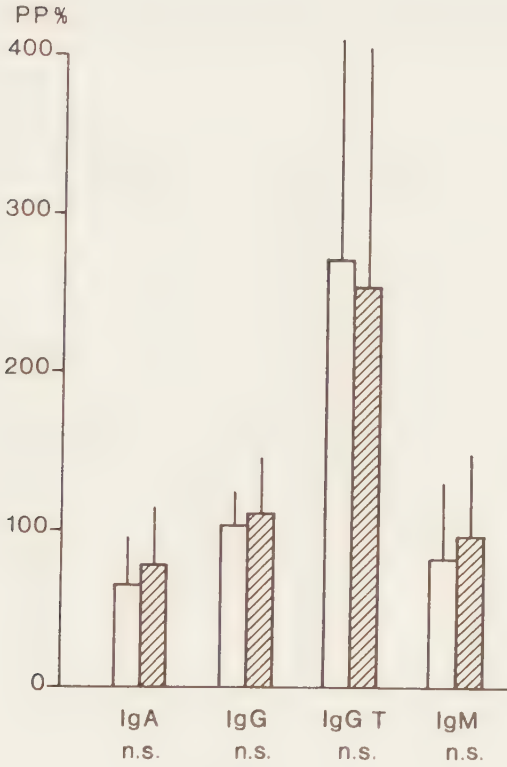
Tabelle 4: Relative Konzentrationen der Ig-Klassen, bezogen auf den Standard PP = 100% (siehe Methoden, Seite 27)

	Anzahl Pferde	Ig A	Ig G $\bar{x} + s$	Ig G T [PP-%]	Ig M
leichtgradige COPD	42	66 $\pm$ 32	104 $\pm$ 24	271 $\pm$ 138	82 $\pm$ 50
schwergradige COPD	50	82 $\pm$ 38	112 $\pm$ 37	255 $\pm$ 148	94 $\pm$ 59
Signifikanz		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.*

* n.s. nicht signifikanter Unterschied

Abbildung 2:

Relative Serumkonzentrationen von Ig



□ leichtgradige } COPD
▨ schwergradige }

n.s. = nicht signifikanter Unterschied

c) Proteaseinhibitoren

Hinsichtlich der Serumkonzentrationen der beiden Proteaseinhibitoren, α_1 -PI und α_2 -M, konnten zwischen den Pferden mit leichtgradiger COPD und schwergradiger COPD keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 5 und Abbildung 3 fassen die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (s) der Serumkonzentrationen der Proteaseinhibitoren beider Patientengruppen zusammen.

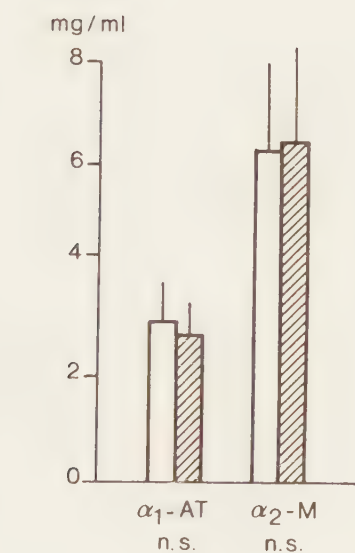
Tabelle 5: α_1 -PI- und α_2 -M-Konzentrationen im Serum

	Anzahl Pferde	α_1 -PI $\bar{x} \pm s$	α_2 -M [mg/ml]
leichtgradige COPD	42	$3.1. \pm 0.7$	6.3 ± 1.7
schwergradige COPD	50	2.8 ± 0.6	6.5 ± 1.8
Signifikanz		n.s.	n.s.*

* n.s. nicht signifikanter Unterschied

Abbildung 3:

α_1 -AT und α_2 -M - Konzentrationen im Serum



□ leichtgradige } COPD
▨ schwergradige }

n.s. = nicht signifikanter Unterschied

2. Konzentrationen im Bronchialsekret (BS)

a) Albumin

Pferde mit schwergradiger COPD wiesen signifikant höhere Albuminkonzentrationen im BS auf als die Pferde mit leichtgradiger COPD ($p < 0.01$).

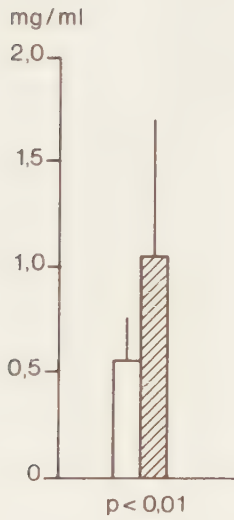
Tabelle 6 und Abbildung 4 fassen die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (s) der Albuminkonzentrationen im BS der beiden Patientengruppen zusammen.

Tabelle 6: Albuminkonzentrationen im BS

	Anzahl Pferde	BS-Albuminkonzentration $\bar{x} \pm s$ [mg/ml]
leichtgradige COPD	42	0.57 ± 0.21
schwergradige COPD	50	1.05 ± 0.67
Signifikanz		$p < 0.01$

Abbildung 4:

Albuminkonzentrationen in BS



☐ leichtgradige } COPD
☒ schwergradige }

b) Immunglobuline

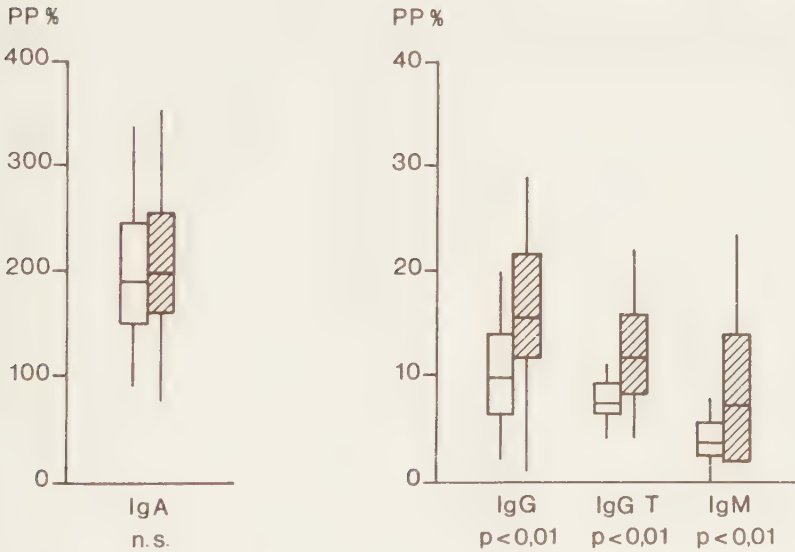
- a) Pferde mit schwergradiger COPD wiesen signifikant höhere Konzentrationen an Ig G, Ig G T und Ig M im Bronchialsekret auf als Pferde mit leichtgradiger COPD ($p < 0.01$).
- b) Bezüglich der relativen Konzentrationen des Ig A konnte zwischen den Pferden mit leichtgradiger COPD und schwergradiger COPD kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auf eine tabellarische Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen der Ig im BS wurde verzichtet, weil den Daten schiefe Verteilungen zugrunde liegen, und deshalb die Mittelwerte und Standardabweichungen keinen Aussagewert haben.

Abbildung 5 stellt relative Mengen und Verteilungen der einzelnen Ig-Klassen und Patientengruppen in Boxplotform unter Angabe der Signifikanzen dar.

Abbildung 5:

Relative Konzentrationen von Ig im Bronchialsekret



□ leichtgradige } COPD
▨ schwergradige }

n.s. = nicht signifikanter Unterschied

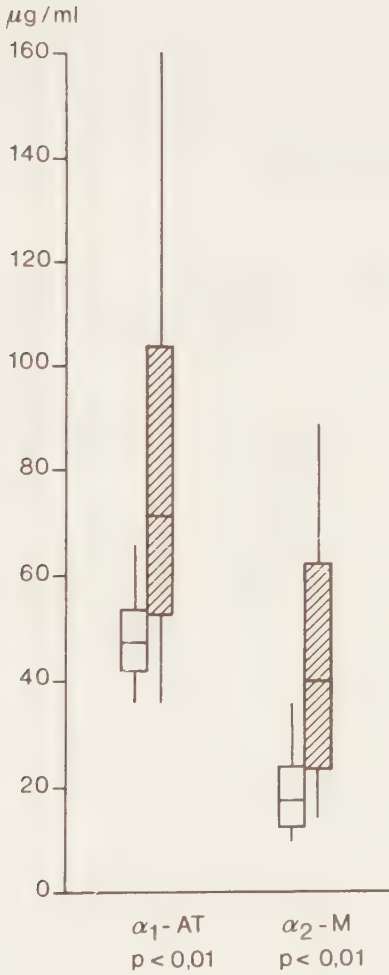
c) Proteaseinhibitoren

Pferde mit schwergradiger COPD wiesen signifikant höhere Konzentrationen von α_1 -PI und α_2 -M im BS auf als die Pferde mit leichtgradiger COPD ($p \leq 0.01$).

Abbildung 6 stellt die Mengen und Verteilungen der zwei Proteaseinhibitoren für beide Patientengruppen in Boxplotform dar.

Auf eine tabellarische Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardabweichungen wird hier aus dem gleichen Grund wie bei den Ig im Bronchialsekret verzichtet.

α_1 -AT und α_2 -M - Konzentrationen im BS



□ leichtgradige } COPD
▨ schwergradige }

3. RCE

Pferde mit hochgradiger COPD besaßen einen RCE für Ig A, der signifikant kleiner war als derjenige von Pferden mit leichtgradiger COPD ($p < 0.01$). Die Sekretionsrate war also verändert. Bei den drei übrigen Ig-Klassen (Ig G, Ig G T und Ig M) wie auch bei den beiden Proteaseinhibitoren (α_1 -PI und α_2 -M) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des RCE bei beiden Patientengruppen festgestellt werden.

Alle Immunglobulinklassen wiesen RCE auf, die über dem Wert 1 lagen, wobei der RCE des Ig A ca. 10 bis 200 mal höher lag als die RCE der übrigen Ig-Klassen.

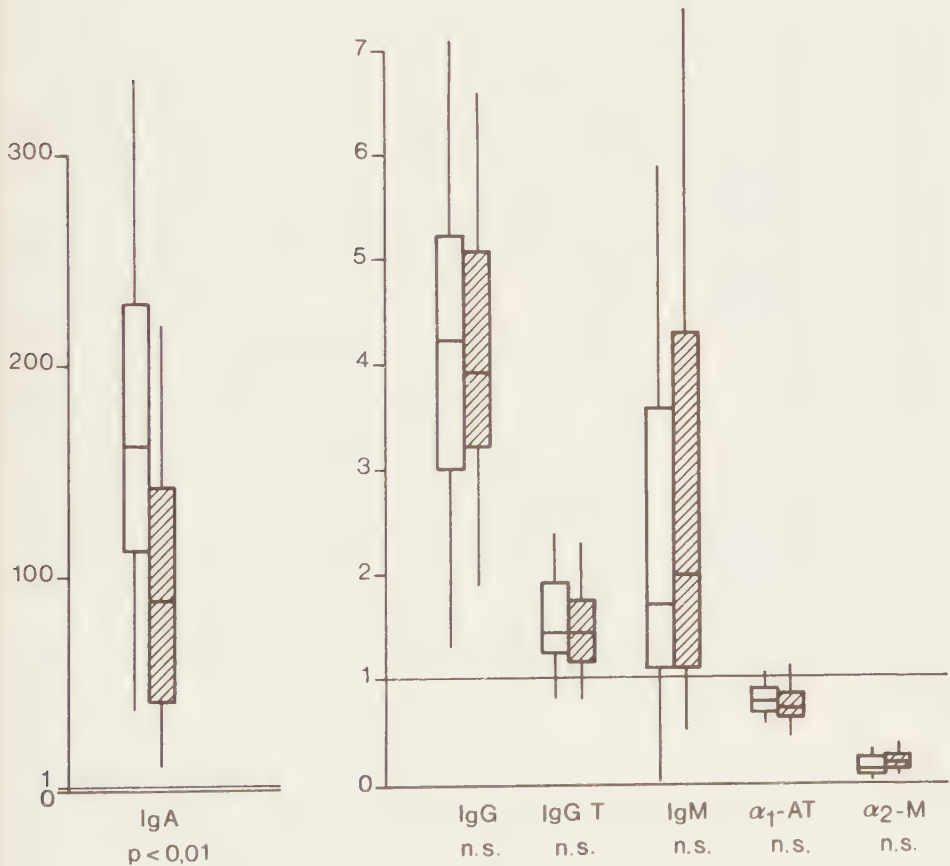
Beide Proteaseinhibitoren wiesen RCE auf, die unter dem Wert 1 lagen, wobei der RCE des α_2 -M deutlich geringer als der RCE des α_1 -PI ist.

Abbildung 7 stellt die Verteilungen der RCE der vier Immunglobuline und der beiden Proteaseinhibitoren der beiden Patientengruppen dar. Es wurde wiederum die Boxplotdarstellung gewählt, weil zum Teil schiefe Messdatenverteilungen vorlagen.

Abbildung 7:

RCE (relative coefficient of excretion)

$$\text{RCE} = \frac{\frac{\text{Sekret Protein}}{\text{Protein Serum}}}{\frac{\text{Sekret Albumin}}{\text{Albumin Serum}}}$$



☐ leichtgradige
☒ schwergradige

} COPD

IV DISKUSSION

Um einen Eindruck über Auswirkungen des Schweregrades der COPD des Pferdes auf die humorale Immunität zu erhalten, wurden Konzentrationsmessungen der vier wichtigsten Ig-Klassen/-Subklassen des Pferdes im Serum und Bronchialsekret durchgeführt. Generell muss erwähnt werden, dass durch die Anwendung der radialen Immundiffusion keine Aussagen bezüglich der Reaktivität der gemessenen Immunglobuline gegenüber Antigenen gemacht werden konnten. Zur Beurteilung standen also nur die festgestellten Konzentrationen der Ig zur Verfügung. Um die Rolle der beiden Proteaseinhibitoren α_1 -PI und α_2 -M im Zusammenhang mit der Pferde-COPD abzuschätzen, wurden ihre Serum- und BS-Konzentrationen bestimmt. Die radiale Immundiffusion, die auch hier zur Konzentrationsbestimmung angewendet wurde, besagt jedoch nicht, ob es sich um aktive oder inaktive Proteaseinhibitoren oder um Proteasen-Proteaseninhibitoren-Komplexe handelte. So konnten wir nur Schlüsse aus den jeweiligen Konzentrationen ziehen, die sicherlich auch inaktive Proteaseinhibitoren miterfassen.

1. Serumkonzentrationen der Ig

Die Serumkonzentrationen der Ig der leichtgradig und schwergradig COPD-kranken Pferde sollten uns die Beurteilung ermöglichen, ob sich ein zunehmender COPD-Schweregrad beim Pferd auf die Serum-Ig-Konzentrationen auswirkt.

Ig A

Dem Ig A wird in diesem Zusammenhang eine besondere Beachtung geschenkt, denn es handelt sich um das Immunglobulin, welches bei der humoralen Immunität der Schleimhäute eine wesentliche Rolle spielt; gerade bei der COPD stehen ja Affektionen der Schleimhaut des Respirations-

traktes im Vordergrund. Wie aus unseren Resultaten ersichtlich ist, wirkte sich der Schweregrad der COPD beim Pferd nur wenig auf die Serum-Ig-A-Konzentrationen aus. Es liess sich jedoch ein Trend feststellen, dass Pferde mit schwergradiger COPD zu erhöhten Serum-Ig-A-Spiegeln neigten. Wir sprechen nur von einem Trend, denn der festgestellte Unterschied weist eine Signifikanz von $p < 0.05$ auf; wir haben jedoch ein Signifikanz-Niveau von $p < 0.01$ als kritischen Grenzwert in unseren Auswertungen angenommen. Dieses Ergebnis weist in die gleiche Richtung wie die Resultate von WENDEL und TESSENOW 1981, die festgestellt haben, dass Menschen mit chronischer Bronchitis erhöhte Serum-Ig-A-Werte gegenüber gesunden Kontrollen aufwiesen. BIEGEL und KRUMHOLZ 1968 stellten bei Patienten mit obstruktiven Lungenemphysemen auch erhöhte Serum-Ig-A-Konzentrationen fest. Durch welche Mechanismen die besagte Serum Ig-A-Erhöhung zustande kommt, bleibt offen.

Die anderen Ig-Klassen

Bezüglich das Ig G konnte keine signifikante Aenderung der Serum-Ig-G-Konzentration bei Pferden mit schwergradiger COPD beobachtet werden. Gleichwertige Resultate konnten auch DERKSEN et al. 1986 feststellen. Dies steht im Widerspruch zum Resultat beim Menschen von WENDEL und TESSENOW 1981, die eine starke Abnahme der Serum-Ig-G-Spiegel bei chronischen Bronchitikern festgestellt haben. Die Diskrepanz der beiden Beobachtungen könnte im Speziesunterschied aber auch in der Abweichung bei der Gruppeneinteilung liegen, denn WENDEL und TESSENOW haben gesunde und kranke Individuengruppen miteinander verglichen. GUMP et al. 1973 berichteten, dass bei Patienten mit chronischer Bronchitis die Serum-Ig-G-Spiegel signifikant höher lagen als bei gesunden Kontrollen. Aus diesen widersprüchlichen Resultaten lassen sich keine schlüssigen Aussagen erstellen, die die Rolle des Serum-Ig-G bei der

COPD näher deuten könnten.

Wie beim Ig G, so auch beim Ig G T, das eine Subklasse von Ig G darstellt, liess sich in unseren Untersuchungen keine signifikante Verschiebung der Serumkonzentration bei den schwergradigen COPD-Pferden gegenüber den leichtgradigen COPD-Pferden nachweisen. Auffällig ist bei den Serum-Ig-G-T-Werten beider Patientengruppen die starke Streuung. In der Arbeit von DERKSEN et al. 1985 wurden auch keine Veränderungen von Serum-Ig-G-T-Werten bei COPD-Ponies beobachtet.

Auch bei der Serum-Ig-M-Bestimmung wurden keine auffälligen Veränderungen der Konzentrationswerte bei beiden Patientengruppen festgestellt. Die Serum-Ig-M-Werte beider Patientengruppen wiesen eine starke Streuung auf, die dem Serum-Ig G T vergleichbar war. Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten von DERKSEN et al. 1985. Auch beim Menschen wurden keine wesentlichen Serum-Ig-M-Veränderungen bei COPD-Patienten beobachtet (GUMP et al. 1973, WENDEL und TESSENOW 1981, FALK et al. 1972).

2. Serumkonzentrationen der Proteaseinhibitoren α_1 -PI und α_2 -M

Anhand der vorliegenden Resultate lässt sich feststellen, dass die Serumkonzentration des α_1 -PI bei steigendem Schweregrad der COPD des Pferdes keinen signifikanten Veränderungen unterlag. Das gleiche Ergebnis bezüglich der Serum- α_1 -PI-Konzentration erhielt WINZAP 1986 bei seinen Untersuchungen an teils identischem Pferdmaterial, wobei er seine Konzentrationen mit der Rocketimmunoelektrophorese ermittelte. FRETZ 1984 stellte bei Messungen von Serum- α_1 -PI-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und COPD-kranken Pferden fest. Aus diesen Resultaten lässt sich schliessen, dass keine

Konzentrationsänderungen des α_1 -PI im Serum von Pferden mit schwergradiger COPD vorlagen.

Auch bezüglich der Serum- α_2 -M-Konzentration konnte zwischen den leichtgradig und schwergradig COPD-kranken Pferden kein signifikanter Unterschied eruiert werden. FRETZ 1984 stellte bei COPD-Pferden einen leichten Anstieg der Serum- α_2 -M-Konzentration bei gleichzeitiger Aktivitätssteigerung gegenüber gesunden Kontrollpferden fest. Diese Resultate lassen darauf schliessen, dass keine Mangelsituation bezüglich des Serum- α_2 -M bei COPD-Pferden vorliegt.

3. Ig-Konzentrationen im Bronchialsekret (BS)

Unser Hauptaugenmerk richtete sich in dieser Arbeit auf die Immunglobulinwerte im BS COPD-kranker Pferde. Die Lunge stellt bezüglich der Immunität ein kompetentes und teils auch autonomes Organsystem dar. Das Bronchialsekret ist das einzige Medium durch das wir ohne nennenswerten Aufwand einen repräsentativen Einblick ins pathophysiologische Geschehen der Bronchien bekommen können (z.B. Zytologie). Durch quantitative Bestimmung der Ig-Klassen im BS wollten wir erfahren, ob und wie sich COPD-Zustände beim Pferd im Immunglobulingehalt des Bronchialbaumes widerspiegeln.

Wie bereits erwähnt, ist Ig A das wichtigste Immunglobulin in Sekreten, so auch im BS. Als erstes muss man feststellen, dass die Ig A-Konzentrationen im BS bei beiden Patientengruppen doppelt bis dreifach höher lagen als die entsprechenden Serum-Ig-A-Konzentrationen. Dies unterstreicht die Bedeutung des Ig A in der mukosalen Immunität des Bronchialbaumes. DERKSEN et al. 1985 konnten

sowohl bei gesunden als auch bei COPD-kranken Ponies in der Spülflüssigkeit nach Bronchialwaschungen die gleiche Situation beobachten. REYNOLDS und NEWBALL 1974 stellten beim Menschen sogar eine Verzehnfachung des Ig-A-Gehaltes in Bronchialwaschungen gegenüber entsprechenden Serum Ig-A-Werten fest.

Ueberraschend konnten wir im BS keinen signifikanten Ig-A-Konzentrations-Unterschied zwischen leichtgradig und schwergradig COPD-kranken Pferden beobachten, denn bei den anderen Ig-Klassen waren die Konzentrationen bei der Gruppe der schwergradig Kranken signifikant erhöht (siehe unten). Ig A wird zu mehr als 90% lokal synthetisiert (MORGAN et al. 1980) und unterliegt einem komplexen trans-epithelialen Transport ins BS. Der Schluss liegt deshalb nahe, das veränderte Bronchialepithel für einen beeinträchtigten Transport von Ig A verantwortlich zu machen. Weiter ist zu bemerken, dass gerade die am meisten bei der COPD geschädigten Strukturen (Trachea, Bronchien und Bronchiolen) im unbeeinträchtigten Zustand den grössten Ig A-Umsatz (Synthese, Ausscheidung) im Vergleich mit den übrigen Ig im Respirationstrakt aufweisen (MORGAN et al. 1980).

Aus den Abbildungen 2 und 5 ist ersichtlich, dass die BS-Konzentrationen von Ig G, Ig G T und Ig M ca. 5 bis 20fach niedriger lagen als die entsprechenden Serumkonzentrationen. Diese Ergebnisse bestätigen die Feststellungen von HERMANN 1984. Dies deutet darauf hin, dass die drei Ig-Klassen weniger an der mukosalen Immunität der luftleitenden Strukturen beim Pferd beteiligt sind als das Ig A. Die Ig G-, Ig G T- und Ig M-Konzentrationen im BS waren aber bei den schwergradig COPD-kranken Pferden signifikant erhöht gegenüber den entsprechenden Konzentrationen bei den leichtgradig erkrankten Tieren. Ob dieser Effekt spezifisch mit verbesserter Infektionsabwehr zu-

sammenhängt, bleibt aber fraglich. Dies umso mehr, als alle bestimmten Proteine - mit Ausnahme von Ig A - im BS der hochgradig Erkrankten erhöht waren (siehe unten).

4. Proteaseinhibitoren-Konzentrationen (α_1 -PI und α_2 -M) im BS

Wie aus unseren und den Untersuchungen von FRETZ 1984 und WINZAP 1986 hervorgeht, blieben die Konzentrationen von α_1 -PI und α_2 -M im Serum bei der COPD des Pferdes mit grosser Wahrscheinlichkeit unverändert. Darum kam den Konzentrationsbestimmungen von α_1 -PI und α_2 -M im BS eine vermehrte Bedeutung zu. Im Vordergrund unseres Interesses stand die Frage, ob im BS schwergradig COPD-kranker Pferde eventuell ein verminderter Gehalt an Proteaseinhibitoren vorliegen könnte, der die Entstehung proteaseinduzierter Lungenveränderungen (Emphyseme, Schäden an Bronchien/Bronchiolen) unterstützen würde.

Das Gegenteil war der Fall. Es zeigte sich nämlich, dass Pferde mit schwergradiger COPD signifikant höhere Konzentrationen an beiden Proteaseinhibitoren im BS gegenüber Pferden mit leichtgradiger COPD aufwiesen. Es ist wohl anzunehmen, dass bei den schwergradig COPD-kranken Pferden die erhöhte Gefässdurchlässigkeit zu einem vermehrten Uebertritt der Inhibitoren ins Bronchialsekret führte. Andererseits muss beim α_2 -M die Möglichkeit des vermehrten Uebertrittes ins BS aufgrund des hohen Molekulargewichtes (720'000) relativiert werden. Die erhöhte α_2 -M-Konzentration im BS schwergradiger COPD-Pferde könnte zum Teil aus vermehrter lokaler Synthese stammen. MOSHER 1983 zeigte nämlich, dass kultivierte Lungenfibroblasten zur α_2 -M-Synthese befähigt sind. Es ist anzunehmen, dass bei der COPD, wie bei anderen chronischen Entzündungsprozessen auch, vermehrt Bindegewebe und damit auch Fibroblasten (Fibrozyten-Vorläufer) in der Lunge vorkommen, die für den α_2 -M-Konzentrationsanstieg im BS schwergradig

COPD-kranker Pferde verantwortlich sein könnten. Anhand der erhöhten Konzentrationen beider Proteaseinhibitoren im BS schwergradig COPD-kranker Pferde kann man schliessen, dass sich ein Proteaseinhibitordefizit im BS COPD-kranker Pferde nicht belegen lässt. Es besteht jedoch noch kein Grund, die sogenannte Missverhältnistheorie bezüglich Proteasen und Proteaseinhibitoren und Lungenschädigungen zu verwerfen. Denn wir wissen nicht, ob die gemessenen Proteaseinhibitoren genügende Aktivitäten gegen potentiell pathogene Proteasen in der Lunge entwickeln. Weiter besteht die Möglichkeit, dass sich pathogene Proteasen, seien es exogene (GRUENIG 1984) und/oder endogene Proteasen, im Respirationstrakt der Pferde kumulieren könnten, und dadurch die vorhandenen PI-Konzentrationen im BS doch ungenügend wären.

5. Albuminkonzentration in Serum und BS

Um das Sekretionsverhalten der Immunglobuline und Proteaseinhibitoren in BS anhand des RCE studieren zu können, war es nötig, die Albuminkonzentrationen im Serum und BS zu bestimmen. Darüber hinaus war es interessant zu sehen, wie sich die Albuminkonzentration im BS leichtgradig und schwergradig COPD-kranker Pferde verhalten würde. Wie erwartet, konnten im Serum der beiden Patientengruppen die gleichen Albuminwerte gemessen werden, die Albumin-Normalwerten des Pferdes entsprechen. Im BS hingegen konnte man einen signifikanten Albuminkonzentrationsanstieg bei schwergradig COPD-kranken Pferden gegenüber leichtgradig kranken Pferden beobachten. Dieses Resultat wurde allgemein erwartet, denn man weiss, dass Blutgewebsschranken leichter für Plasmaproteine passierbar werden, je schwerer die Entzündung ist.

6. Die RCE der Ig und PI im BS

Alle vier Ig-Klassen wiesen grössere RCE als 1 auf. Dies

deutet auf einen aktiven Transportmechanismus für die vier Ig-Klassen hin. Ein solcher Mechanismus ist für Ig A nachgewiesen worden (BIENENSTOCK und STRAUSS 1970, BRANDTZAEG 1974, CRAGO et al. 1978). Mit grossem Abstand besitzt Ig A den höchsten RCE. Ig A sezernierende Plasmazellen wurden auch in grosser Zahl in der Mukosa des Respirationstraktes nachgewiesen (BRADLEY et al. 1976).

Die RCE von Ig G, Ig G T und Ig M blieben durch den Schweregrad der COPD unbeeinflusst. Dagegen war in bezug auf das Ig A der RCE schwergradig kranker Tiere signifikant tiefer als derjenige leichtgradig kranker Pferde. Die Sekretion von Ig A ist also bei schwergradiger COPD vermindert. Dieser Befund ist durchaus mit den histopathologischen Veränderungen erklärbar, denn die Epithelzellen sind geschwunden zugunsten der stark vermehrten Becherzellen (WINDER 1986). Hier stellt sich die jedoch nicht beantwortbare Frage, ob die herabgesetzte Ig A-Sekretion ein primäres oder sekundäres Phänomen darstellt.

Die RCE der beiden Proteaseinhibitoren lagen unter 1. Dies bedeutet, dass beide PI weniger gut als Albumin ins BS überwechselten. Der RCE von α_1 -PI lag jedoch nur unwesentlich tiefer als 1, was im fast gleichen Molekulargewicht von α_1 -PI und Albumin begründet sein mag. Der RCE von α_2 -M dagegen war sehr viel kleiner als 1. Möglicherweise beruht diese Retention auf dem sehr hohen Molekulargewicht von α_2 -M und der damit verbundenen niedrigen Ultrafiltration.

Zwischen beiden Patientengruppen bestand kein Unterschied in den RCE von α_1 -PI und α_2 -M. In bezug auf α_2 -M spricht dieser Befund gegen eine vermehrte lokale Produktion von α_2 -M durch Bindegewebszellen, wie dies früher in der Diskussion in Erwägung gezogen wurde.

V ZUSAMMENFASSUNG

Mittels radialer Immundiffusion (RID) wurden die Konzentrationen der Immunglobulin (Ig)-Klassen Ig A, Ig G, Ig G T und Ig M, der Proteaseinhibitoren (PI) α_1 -PI und α_2 -M sowie vom Albumin im Serum und Bronchialsekret (BS) von 42 leichtgradig und 50 schwergradig COPD-kranken Pferden bestimmt. Zusätzlich wurden aus den gemessenen Konzentrationen der Ig und PI die RCE (relative coefficient of excretion) für den Uebertritt vom Blut ins BS ermittelt. Die erhaltenen Grössen wurden auf Unterschiede bezüglich des COPD-Schweregrades überprüft.

Die Serumkonzentrationen der vier Ig-Klassen, beider Proteaseinhibitoren und des Albumins blieben durch den steigenden COPD-Schweregrad unbeeinflusst, wobei für das Ig A ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg bei den schwergradig COPD-kranken Pferden beobachtet wurde.

Im Bronchialsekret waren Ig G, Ig G T, Ig M, α_1 -PI und α_2 -M bei den schwergradig erkrankten Pferden erhöht. Ig A war nicht erhöht.

Die vier Ig-Klassen hatten einen RCE grösser als 1, wurden also besser ins BS ausgeschieden als Albumin. Der RCE von Ig A war mit 100-200 am grössten, die RCE der drei anderen Ig-Klassen betrugen 2-5. Nur die Ig A-Sekretion ins BS wurde durch den Schweregrad der COPD beeinflusst, denn der RCE war bei den schwergradig COPD-kranken Pferden signifikant herabgesetzt.

Die RCE der Proteaseinhibitoren waren kleiner als 1, wurden also schlechter als Albumin ins BS transportiert. Die PI-Konzentrationen waren im BS schwergradig COPD-kranker Pferde erhöht, die RCE blieben jedoch unverändert.

VI LITERATURVERZEICHNIS

ALLEN, P.Z. and JOHNSON, J.S. (1972):

Studies on equine immunoglobulins. III. Antigenetic interrelationship among horse and dog G globulins. Comp. Biochem. Physiol. 41 B, 371-383.

BIEGEL, A.A. and KRUMHOLZ, R.A. (1968):

An immunoglobulin abnormality in pulmonary emphysema. Am. Rev. Resp. Dis. 97, 217-222.

BIENENSTOCK, J. and STRAUS, H. (1970):

Evidence for synthesis of human colostral Ig A as 11 S dimer.

J. Immunol. 105, 274-277.

BIENENSTOCK, J., JOHNSTON, N. and PEREY, D.Y.E. (1973):

Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics.

Lab. Invest. 28, 693-698.

BIENENSTOCK, J. (1985):

Bronchus associated lymphoid tissue.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 76, suppl. 1, 62-69.

BOULTON, C.H., HAHN, A.H. and GARNER, H.E. (1983):

Veterinary medical data program as a source of equine epidemiology: Equine respiratory disease.

Newsletter, Am. Ass. of Equine Practitioners, July 1983, No. 2, 55-59.

BRADLEY, P.A., BOURNE, F.J. and BROWN, P.J. (1976):

The respiratory immune system in the pig.

I. Distribution of immunoglobulin-containing cells in the respiratory tract mucosa.

Vet. Pathol. 13, 81-89.

BRANDTZAEG, P. (1974):

Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components:

Differential localisation of free and bound SC in secretory epithelial cells.

J. Immunol. 112, 1553-1559.

BROWN, W.R., NEWCOMB, R.W. and ISHIZAKA, K. (1970):

Proteolytic degradation of exorcine and serum immunoglobulins.

J. Clin. Invest. 49, 1374-1380.

CIBA (1959):

Terminology, definition and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. A report of the conclusions of a CIBA Guest Symposium.

Thorax 14, 286-299.

CLAMP, J.R. (1978):

Mucus.

Brit. Med. Bull. 34, 1-94.

CRAGO, S.S. and KULHAVY, R., PRINICE, S.J. and MESTECKY, J. (1978):

Secretory component on epithelial cells is a surface receptor for polymeric immunoglobulins.

J. Exp. Med. 147, 1832-1837.

DAHME, E. und WEISS, E. (1978):

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.

Verlag Enke, Stuttgart.

DAMMANN-TAMKE, U. (1982):

Die chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes.
Eine Literaturstudie.
Diss. Hannover.

DECONTO, I. (1983):

Zytologische und bakteriologische Untersuchungen des
Tracheobronchialsekretes bei chronisch lungenkranken
Pferden.
Diss. Hannover.

DELACROIX, D.L., MARCHANDISE, F.X., FRANCIS, C. and
SIBILLE, Y. (1985):

α_2 -macroglobulin, monomeric and polymeric immuno-
globulin A, and immunoglobulin M in bronchoalveolar
lavage.

Am. Rev. Resp. Dis. 132, 829-835.

DERKSEN, F.J., SCOTT, J.S., MILLER, D.C., SCOLOMBE, R.F.
and ROBINSON, N.E. (1985):

Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway
obstruction (heaves).

Am. Rev. Resp. Dis. 132, 1066-1070.

DUBIN, A., KOJ, A. and CHUDZIK, J. (1976):

Isolation and some molecular parameters of elastase-
like neutral proteinases from horse blood leucocyte.
Biochem. J. 153, 389-396.

EGGENBERGER, E. und THUN, R. (1984):

Eine graphische Methode zur Darstellung von Messdaten.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 199-205.

FALK, G.A., OKINAKA, A.J. and SISKIND, G.W. (1972):

Immunoglobulins in the bronchial washings of patients with chronic obstructive pulmonary diseases.

Am. Rev. Resp. Dis. 105, 14-21.

FELLENBERG von, R. (1978a):

Kompodium der allgemeinen Immunologie.

Verlag Parey, Berlin, Hamburg.

FELLENBERG von, R. (1978b):

Elektrophoretische Analyse der Proteaseinhibitoren von Pferdeserum.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 120, 631-642.

FISCHER, J. (1980):

Bronchoskopische Untersuchungen als Beitrag zur klinischen und ätiologischen Diagnostik beim Pferd mit Atemwegserkrankungen.

Diss. Hannover.

FRETZ, D. (1984):

Proteaseinhibitoren und chronisch obstruktive Lungenkrankheiten beim Pferd.

Diss. Zürich.

GERBER, H. (1969a):

Klinik und Therapie chronischer Lungenleiden des Pferdes.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 76, 234-239.

GERBER, H. (1973):

Chronic pulmonary disease in the horse.

Equine vet. J. 5, 26-33.

GILLESPIE, J.R. and TYLER, W.S. (1967):

Capillary and cellular changes in alveolar walls of emphysematous horse lungs. A quantitative microscope study.

Am. Rev. Resp. Dis. 95, 484-490.

GILLESPIE, J.R. and TYLER, W.S. (1969):

Chronic alveolar emphysema in the horse.

Adv. vet. Sci. comp. Med. 13, 59-99.

GREEN, G.M., JAKOB, G.J., LOW, R.B. and DAVIS, G.S. (1977):

Defense mechanisms of the respiratory membrane.

Am. Rev. Resp. Dis. 115, 479-514.

GROSS, P., PFITZER, E.A., TOLKER, E., BABYAK, M.A. and KASCHAK, M. (1965):

Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats.

Arch. environm. Health 11, 50-58.

GRUENIG, G. (1984):

Zur Aethiologie und Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenkrankheiten (COPD) des Pferdes.

Diss. Zürich.

GUMP, D.W., CHRISTMAS, W.A., FORSYTH, B.R., PHILLIPS, C.A. and STOUCH, W.H. (1973):

Serum and secretory antibodies in patients with chronic bronchitis.

Arch. Intern. Med. 132, 847-851.

HALLIWELL, K.E.W., FLEISCHMAN, J.B., MACKAY-SMITH, M.,

BEECH, J. and GUNSON, D.E. (1979):

The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses.

J. Am. vet. med. Ass. 174, 277-281.

HERMANN, R. (1984):

Lysozym- und Immunoglobulinbestimmungen im Tracheo-bronchialsekret von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis.

Diss. Hannover.

JANOFF, A., SLOAN, B., WEINBAUM, G., DAMIANO, V., SANDHAUS, R.A., ELIAS, J. and KIMBEL, P. (1977):

Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localisation of the instilled protease.

Am. Rev. Res. Dis. 115, 461-478.

JANOFF, A. (1983):

Proteases and Lung injury; a state-of-the-art-mimireview. Chest 83, (Suppl.), 54-58.

JOHANSON, W.G. and PIERCE, A.K. (1972):

Effects of elastase, collagenase and papain on structure and function of rat lungs in vitro.

J. Clin. Invest. 51, 288-293.

KABAT, E. A. and PEDERSON, K.O. (1938):

The molecular weights of antibodies.

Science N.Y. 87, 372.

KALTREIDER, H.B. and CHAN, M.K.L. (1976):

The class-specific immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of the canine respiratory tract.

J. Immunol. 116, 423-429.

KARLINSKY, J.B. and SNIDER, G.L. (1978):

Animal models of emphysema.

Am. Rev. Resp. Dis. 117, 1109-1133.

KLINMAN, N.R., ROCKEY, J.H. and KARUSH, F. (1965):

Equine antihapten antibody. II. The γ G (7 S γ) components and their specific interaction.

Int. J. Immunochem. 2, 51-60.

KOSHLAND, M.E. (1975):

Structure and function of the J chain.

Adv. Immunol. 20, 41-69.

LAURELL, C.B. and ERIKSSON, S. (1964):

Hypo- α_1 -antitrypsinämie.

Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 70, 537-539.

LAURELL, C.B. and ERIKSSON, S. (1965):

The serum α_1 -antitrypsin in families with hypo- α_1 -antitrypsinämie.

Clin. Chim. Acta 11, 395-398.

LOPEZ-VIDRIERO, M.T. and REID, L. (1978):

Bronchial mucus in health and disease.

Brit. Med. Bull. 34, 63-74.

MACH, J.P. (1970)ä

In vitro combination of human and bovine free secretory component with Ig A of various species.

Nature (London) 228, 1278-1282.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J.F. (1965):

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochem. 2, 235-254.

MARTINEZ-TELLO, F.J., BRAUN, D.G. and BLANC, W.A. (1968):
Immunoglobulin production in bronchial mucosa and bronchial lymph nodes, particularly in cystic fibrosis of the pancreas.

J. Immunol. 101, 989-1003.

McDERMOTT, M.R., BEFUS, A.D. and BIENENSTOCK, J. (1982):
The structural basis for immunity in the respiratory tract.

Int. Rev. exp. Pathol. 23, 47-112.

McGUIRE, T.C. and CRAWFORD, T.B. (1972):

Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A.

Infection and Immunity 6, 610-615.

McGUIRE, T.C., CRAWFORD, T.B. and HENSON, J.B. (1972):

The isolation, characterisation and functional properties of equine immunoglobulin classes and subclasses. in J.T. BRYANS and H. GERBER (Hrsg.): Equine Infectious Diseases III.

Verlag Karger, Basel, 1973, 364-381.

MONTGOMERY, P.C. (1973):

Molecular aspects of equine antibodies.

in: J.T. BRYANS and H. GERBER (Hrsg.): Equine Infectious Diseases III.

Verlag Karger, Basel, 1973, 343-363.

MORGAN, K.L., HUSSEIN, A.M., NEWBY, T.J. and BOURNE, F.J. (1980):

Quantification and origin of the immunoglobulins in porcine respiratory tract secretions.

Immunol. 41, 729-736.

MOSHER, D.F. (1983):

Synthesis of α_2 -macroglobulin by cultured adherent cells.
Annals of the New York Academy of Sciences 421, 327-331.

NELSON, R., and HAMPE, D.W. (1983):

Measurement of tracheal mucous transport rate in the horse.

Am. J. Vet. Res. 44, 1165-1166.

NEWCOMB, R.W., NORMANSELL, D. and STANWORTH, D.R. (1968):

A structural study of human exorcine Ig A globulin.
J. Immunol. 101, 905-914.

NUYTEN, J., MUYLLE, E., OYAERT, W., HENDE, C. v.d.,
VLAMINCK, K. and KEERSMAECKER, F.D. (1983):

Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheo-bronchial aspirates in healthy horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Zbl. Vet. Med. A 30, 114-120.

OHLSSON, K. and OLSSON, I. (1973):

The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases.

Eur. J. Biochem. 36, 473-481.

OHLSSON, K. and OLSSON, I. (1974):

The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastase.

Eur. J. Biochem. 42, 519-527.

PAHUD, J.-J. and MACH, J.-P. (1972):

Equine secretory Ig A and secretory component.

Int. Arch. Allergy 42, 175-186.

- PAULI, B., GERBER, H. and SCHATZMANN, U. (1972):
"Farmers lung" beim Pferd.
Path. Microbiol. 38, 200-214.
- PELLEGRINI, A. and FELLEBERG von, R. (1980):
Fractionation and partial characterization of alpha-1
-protease inhibitors of horse.
Biochem. Biophys. Acta 616, 351-361.
- PELLEGRINI, A., ZWEIFEL, H.R. and FELLEBERG von R., (1983a):
Identification of the second α_2 -antiprotease of equine
serum as antithrombin III.
Int. J. Biochem. 15, (7), 917-922.
- PELLEGRINI, A., ZWEIFEL, H.R. and FELLEBERG von, R.
(1983b):
Isolation and characterization of horse α_2 -macroglo-
bulin protease inhibitor.
Int. J. Biochem. 15, (8), 1003-1011.
- PELLEGRINI, A. and FELLEBERG von, R. (1984):
The isolation and characterization of a new elastase
inhibitor, pre- α_2 -elastase inhibitor, of the horse.
Biochem. Biophys. Acta 797, 336-342.
- PORRO, M., VITI, S., ANTONI, G. and SALETTI, M. (1982):
Ultrasensitive silverstain method for the detection
of proteins in polyacrylamid gels and immunoprecipi-
tates on agarose gels.
Anal. Biochem. 127, 316-321.
- REYNOLDS, H.Y. and NEWBALL, H.H. (1974):
Analysis of proteins and respiratory cells obtained
from human lungs by bronchial lavage.
J. Lab. Clin. Med. 84, 559-573.

REYNOLDS, N.Y. and MERRILL, W.W. (1980):

Lung immunology: The inflammatory response in lung parenchyma.

Curr. Pulmonol. 2, 299-323.

RINDLER, R. and BRAUNSTEINER, H. (1975):

Cationic proteins from human neutrophil granulocytes evidence for their chymotrypsin-like properties.

Biochem. Biophys. Acta 379, 606-617.

ROBERTS, M.C. (1975):

Equine immunoglobulins and the equine immune system.

Vet. Annual 15, 192-203.

SACHS, L. (1984):

Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden.

6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

SASSE, H.H.L. (1971):

Some pulmonary function tests in horses.

An aid to an early diagnosis of chronic obstructive pulmonary diseases (heaves) in horses.

Utrecht, Rijksuniversiteit, Proefschrift.

SCHNITZLEIN, C.T., BICE, D.E. and TUTTLE, W.C. (1978):

Isolation of canine α_1 -antitrypsin: its interaction with pulmonary macrophages.

Exp. molec. Path. 33, 74-83.

SCHOON, H.-A. und DEEGEN, E. (1983):

Histopathologie der chronisch obstruktiven Bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden.

Tierärztl. Prax. 11, 213-221.

TOMASI, T.B. and BIENENSTOCK, J. (1968):

Secretory immunoglobulins.

Adv. Immunol. 9, 1-96.

TOMASI, T.B. and GREY, H.M. (1972):

Structure and function of immunoglobulin A.

Prog. Allergy 16, 81-213.

TOMASI, T.B. and HAUPTMAN, S.P. (1974):

The binding of α_1 -antitrypsin to human Ig A.

J. Immunol. 112, 2274-2277.

VAERMAN, J.-P., QUERINJEAN, P. and HEREMANS, J.F. (1971):

Studies on the Ig A system of the horse.

Immunol. 21, 443-454.

WEINBAUM, G., TAKAMOTO, M., SLOAN, B. and KIMBEL, P. (1976):

Lung antiprotease: a potential defense against emphysema development.

Am. Rev. Resp. Dis. 113, 245-248.

WEIR, R.C. and PORTER, R.R. (1966):

Comparison of the structure of the immunoglobulins from horse serum.

Biochem. J. 100, 63-68.

WENDEL, H., und TESSENOW, W. (1981):

Quantitative Immunglobulinbestimmungen bei chronisch obstruktiver Bronchitis.

Z. ges. inn. Med. 36, 416-418.

WINDER, C. (1986):

Mündliche Mitteilung.

WINZAP, B. (1986):

PI-Konzentrationen und deren Aktivitäten im Serum COPD-
kranker Pferde.

Diss. Zürich, im Druck.

ZOLLA, S. and GOODMAN, J.W. (1968):

An aggregating immunoglobulin in hyperimmune equine
antipneumococcal sera.

J. Immunol. 100, 880-897.

An dieser Stelle möchte ich herzlich danken:

- Herrn Prof. Dr. R. von Fellenberg für die Auswahl des Themas, die stete Betreuung im Verlaufe der ganzen Arbeit und die Uebernahme des Referates
- Herrn PD Dr. H. Lutz für die Uebernahme des Korreferates
- Herrn Dr. A. Pellegrini für die wissenschaftliche Beratung
- Frau Dr. G. Grünig und Frau Tzt. V. Bracher für die Entnahmen der Blut- und Bronchialsekretproben
- Frau G. Hägeli und Herrn H.R. Zweifel für die Aufbereitung der Antiseren
- Frau A. Hug für die photographischen Arbeiten
- Frau S. Pletscher für die Ausführung der graphischen Darstellungen
- Meiner Frau für die sorgfältige Abfassung dieser Arbeit

Lebenslauf

Preller Josef, geboren am 20. September 1957 in Lomnice
n.P. (CSSR)

Bürger von Zürich

verheiratet

1963 - 1968	Primarschule in Lomnice n.P.
1968	in die Schweiz übergesiedelt
1969 - 1971	Primarschule in Zürich
1971 - 1974	Sekundarschule in Zürich
1974 - 1978	Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium, Kantonsschule ZH-Oerlikon
1978	Matura Typ C
1978 - 1983	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich
1983	Staatsexamen als Tierarzt
1985 - 1986	Assistent am Institut für Veterinär- Physiologie, Abteilung für Angewandte Veterinär-Physiologie der Universität Zürich
seit März 1986	Assistent in Kleintierpraxis

